





© BSN 2008

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Mangala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

| | |
|--|----|
| Daftar isi..... | i |
| Prakata | ii |
| 1 Ruang lingkup..... | 1 |
| 2 Acuan normatif..... | 1 |
| 3 Istilah dan definisi | 1 |
| 4 Komposisi | 1 |
| 5 Syarat mutu | 1 |
| 6 Pengambilan contoh | 2 |
| 7 Cara uji | 2 |
| 8 Syarat lulus uji | 3 |
| 9 Pengemasan..... | 3 |
| 10 Penandaan | 3 |
| Lampiran A (normatif) Cara uji tepung sagu..... | 4 |
| Lampiran B (informatif) Pengambilan contoh | 32 |
| Bibliografi..... | 34 |
| Gambar A.1 - Pati sagu (<i>metroxylon sp</i>) pada pembesaran 400 kali | 7 |
| Gambar A.2 - Peralatan destilasi standar untuk analisis SO ₂ | 17 |
| Gambar A.3 - Metoda pengenceran | 24 |
| Gambar B.1 - Alat pengambil contoh bentuk tombak tunggal | 32 |
| Gambar B.2 - Alat pengambil contoh bentuk sekop ganda | 32 |
| Tabel 1 - Syarat mutu tepung sagu | 1 |
| Tabel 2 - Cara uji tepung sagu | 2 |
| Tabel A.1 - Penetapan gula menurut Luff-Schoorl | 12 |
| Tabel A.2 - Bobot contoh berdasarkan perkiraan bilangan asam dari contoh..... | 14 |
| Tabel A.3 - Jumlah contoh dan volume air suling untuk pengujian residu SO ₂ | 15 |
| Tabel A.4 - Reaksi biokimia <i>E. coli</i> pada uji IMVIC..... | 28 |
| Tabel A.5 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran (0,10 g/ml, 0,01 g/ml dan 0,001 g/ml contoh) | 29 |
| Tabel B.1 - Jumlah contoh yang harus diambil..... | 33 |

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Tepung sagu* ini merupakan revisi SNI 01-3729-1995, *Tepung sagu*, disusun oleh Panitia Teknis 67-04 Makanan dan Minuman

Tujuan penyusunan standar ini adalah:

- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Diversifikasi produk/pengembangan produk;
- Mendukung perkembangan industri tepung sagu.

Rumusan standar ini telah memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang-undang RI No. 7 tahun 1996 tentang Pangan;
2. Peraturan Pemerintah No. 69 tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
3. Peraturan Pemerintah No. 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.

Standar ini telah dibahas dalam rapat teknis dan rapat konsensus lingkup Panitia Teknis pada tanggal 6 Desember 2006 di Jakarta. Hadir dalam rapat konsensus tersebut anggota Panitia Teknis dan wakil produsen konsumen, lembaga pengujian, Lembaga IPTEK dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada bulan Agustus sampai dengan bulan Oktober 2007 dan langsung disetujui menjadi RASNI

Tepung sagu

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan syarat mutu, pengambilan contoh dan cara uji tepung sagu.

2 Acuan normatif

AOAC Official Method, 2000 925.08, Sampling of Flour.

3 Istilah dan definisi

3.1

tepung sagu

pati yang diperoleh dari pengolahan empulur pohon sagu (*Metroxylon sp*) yang bersih dan baik

3.2

benda asing

benda selain tepung sagu yang berasal dari tanaman, tanah, pasir, batu-batuan, dan lain-lain

4 Komposisi

4.1

bahan baku utama

empulur pohon sagu

4.2

bahan tambahan pangan

bahan tambahan pangan (BTP) yang diizinkan untuk tepung sagu sesuai dengan peraturan tentang BTP

5 Syarat mutu

Tabel 1 - Syarat mutu tepung sagu

| No. | Jenis uji | Satuan | Persyaratan |
|-----|-----------|--------|-------------------------------|
| 1 | Keadaan | | |
| 1.1 | Bentuk | - | serbuk halus |
| 1.2 | Bau | - | normal (bebas dari bau asing) |
| 1.3 | Warna | - | putih, khas sagu |
| 1.4 | Rasa | - | normal |

Tabel 1 (lanjutan)

| No. | Jenis uji | Satuan | Persyaratan |
|------|---|------------------|-----------------------|
| 2 | Benda asing | - | tidak ada |
| 3 | Serangga dalam semua bentuk stadia dan potongan-potongannya yang tampak | - | tidak ada |
| 4 | Jenis pati lain selain pati sagu | - | tidak ada |
| 5 | Kehalusan, lolos ayakan 100 mesh (b/b) | % | min. 95 |
| 6 | Kadar air (b/b) | % | maks. 13 |
| 7 | Kadar abu (b/b) | % | maks. 0,5 |
| 8 | Kadar pati | % | min. 65 |
| 9 | Kadar serat kasar (b/b) | % | maks. 0,5 |
| 10 | Derajat asam | ml NaOH 1 N/100g | maks 4,0 |
| 11 | Residu SO ₂ | mg/kg | maks. 30 |
| 12 | Cemaran logam | | |
| 12.1 | Timbal (Pb) | mg/kg | maks. 1,00 |
| 12.2 | Tembaga (Cu) | mg/kg | maks. 10,0 |
| 12.3 | Raksa (Hg) | mg/kg | maks. 0,05 |
| 13 | Cemaran arsen (As) | mg/kg | maks. 0,50 |
| 14 | Cemaran mikroba | | |
| 14.1 | Angka lempeng total | koloni/g | maks. 10 ⁶ |
| 14.2 | E.coli | APM/g | maks. 10 |
| 14.3 | Kapang | koloni/g | maks. 10 ⁴ |

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai AOAC Official Method, 2000 925.08. Sampling of Flour.

7 Cara uji

Cara uji tepung sagu sesuai Tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2 - Cara uji tepung sagu

| No. | Jenis uji | Metode uji sesuai Lampiran A |
|-----|---|------------------------------|
| 1 | Keadaan | |
| 1.1 | Bentuk | |
| 1.2 | Bau | A.1 |
| 1.3 | Warna | |
| 1.4 | Rasa | |
| 2 | Benda asing | A.2 |
| 3 | Serangga dalam semua bentuk stadia dan potongan-potongannya yang tampak | A.3 |
| 4 | Jenis pati lain selain pati sagu | A.4 |
| 5 | Kehalusan, lolos ayakan 100 mesh (b/b) | A.5 |

Tabel 2 (lanjutan)

| No. | Jenis uji | Metode uji sesuai Lampiran A |
|----------------------------|---|------------------------------|
| 6 | Kadar air (% b/b) | A.6 |
| 7 | Kadar abu (% b/b) | A.7 |
| 8 | Kadar pati (% b/b) | A.8 |
| 9 | Kadar serat kasar (% b/b) | A.9 |
| 10 | Derajat asam (ml NaOH 1 N/100g) | A.10 |
| 11 | Residu SO ₂ (mg/kg) | A.11 |
| 12 12.1 12.2 12.3 | Cemaran logam Timbal (Pb) Tembaga (Cu) Raksa (Hg) | A.12 |
| 13 | Cemaran Arsen (As) | A.13 |
| 14 14.1 14.2 14.3 | Cemaran mikroba Angka lempeng total E. coli Kapang | A.14 |

8 Syarat lulus uji

Contoh dinyatakan lulus uji apabila memenuhi persyaratan mutu sesuai Tabel 1.

9 Pengemasan

Tepung sagu dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, baik, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

10 Penandaan

Syarat penandaan tepung sagu dilakukan dengan pemberian label. Keterangan pada label sekurang-kurangnya harus mencantumkan:

- Nama produk;
- Nama dagang;
- Berat bersih;
- Nama dan alamat produsen.

Lampiran A
(normatif)
Cara uji tepung sagu

A.1 Keadaan

A.1.1 Bentuk

A.1.1.1 Prinsip

Pengamatan contoh secara visual.

A.1.1.2 Cara kerja

- a. Taburkan contoh kira-kira 1 sendok makan pada wadah yang bersih.
- b. Lakukan pengamatan terhadap contoh tersebut untuk mengetahui bentuk contoh dengan meraba contoh.

A.1.1.3 Cara menyatakan hasil

- Apabila teraba serbuk, maka contoh tersebut mempunyai bentuk "serbuk".
- Apabila teraba selain serbuk, maka hasil analisis dinyatakan mempunyai bentuk yang menyimpang

A.1.2 Bau

A.1.2.1 Prinsip

Analisis terhadap contoh secara organoleptik dengan menggunakan indera penciuman.

A.1.2.2 Cara kerja

- a. Taburkan contoh kira-kira 1 sendok makan pada wadah yang bersih dan tidak berbau.
- b. Lakukan penciuman terhadap contoh tersebut untuk mengetahui baunya.

A.1.2.3 Cara menyatakan hasil

- a. Apabila tercium bau khas sagu, berarti contoh tersebut mempunyai bau yang normal.
- b. Apabila terdeteksi bau asing selain bau khas sagu yang normal, berarti contoh tersebut mempunyai bau yang menyimpang.

A.1.3 Warna

A.1.3.1 Prinsip

Analisis terhadap contoh secara visual dengan menggunakan indera penglihatan terhadap warna.

A.1.3.2 Cara kerja

- a. Taburkan contoh kira-kira 1 sendok makan pada wadah yang bersih.
- b. Lakukan pengamatan terhadap contoh tersebut untuk mengetahui warna (jarak mata dengan contoh kira-kira 25 cm).

A.1.3.3 Cara menyatakan hasil

- a. Apabila terlihat warna putih khas sagu, berarti contoh tersebut mempunyai warna yang normal.
- b. Apabila terdeteksi warna selain warna putih khas sagu, berarti contoh tersebut mempunyai warna yang menyimpang.

A.1.4 Rasa**A.1.4.1 Prinsip**

Analisis terhadap contoh secara organoleptik dengan menggunakan indera pencicip.

A.1.4.2 Cara kerja

- a. Taburkan contoh kira-kira 1 sendok makan pada wadah yang bersih.
- b. Lakukan pengamatan terhadap contoh tersebut untuk mengetahui rasa dengan cara dicicip.

A.1.4.3 Cara menyatakan hasil

- a. Apabila tercicip rasa khas sagu, berarti contoh tersebut mempunyai rasa yang normal.
- b. Apabila terdeteksi rasa asing selain rasa khas sagu, berarti contoh tersebut mempunyai rasa yang menyimpang.

A.2 Benda asing**A.2.1 Prinsip**

Contoh diamati secara visual dengan indera penglihatan.

A.2.2 Cara kerja

- a. Periksa isi contoh secara visual apakah mengandung benda lain selain tepung sagu misalnya tanah, pasir dan batu-batuan, dan lain-lain.
- b. Lakukan pengamatan terhadap contoh untuk mengetahui adanya benda asing tersebut.

A.2.3 Cara menyatakan hasil

- a. Apabila tidak terlihat benda asing, maka hasil dinyatakan "tidak ada."
- b. Apabila terlihat benda asing, maka hasil analisis dinyatakan menyimpang.

A. 3 Serangga dalam semua bentuk stadia dan potongan-potongannya yang tampak (ulat, kepompong, serangga atau potongan serangga)**A.3.1 Acuan**

AOAC Official Method, 2000 941.16. Filth in Grain Products and Brewer Grits.

A.3.2 Prinsip

Contoh diamati secara visual dengan menggunakan kaca pembesar atau mikroskop.

A.3.3 Peralatan

- Gelas piala 250 ml;
- Corong *Buchner*;
- Kertas saring;
- Kaca pembesar/mikroskop;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 g.

A.3.4 Pereaksi

- Khloroform (CHCl_3);
- Tetra (CCl_4).

A.3.5 Cara kerja

- Timbang 50 g contoh ke dalam piala gelas 250 ml.
- Tambah CHCl_3 sampai 1 cm di atas permukaan contoh, biarkan mengendap minimal selama 30 menit.
- Aduk bagian yang mengambang di atas permukaan lapisan beberapa kali.
- Tuangkan CHCl_3 dan bagian yang mengambang ke dalam corong *Buchner* (hati-hati jangan sampai endapan yang di bagian bawah terbawa).
- Tambah CCl_4 sebanyak volume CHCl_3 dan bagian yang mengambang tertinggal dalam gelas piala.
- Biarkan mengendap lagi dan tuangkan lagi seperti di atas.
- Pengendap-tuangan diulangi dengan campuran CHCl_3 dan CCl_4 sampai bagian yang mengambang tinggal sedikit (hati-hati jangan sampai bagian serangga yang ada ikut terbang).
- Cuci endapan dalam gelas piala dengan CHCl_3 atau CCl_4 melalui kertas saring,
- Amati kertas saring menggunakan kaca pembesar atau mikroskop

A.3.6 Cara menyatakan hasil

- Hasil uji dinyatakan "tidak ada" apabila tidak nampak serangga dalam bentuk stadium dan bentuk potongannya (ulat, kepompong, serangga atau potongan-potongan serangga).
- Apabila terlihat maka hasil uji dinyatakan menyimpang.

A.4 Jenis pati lain selain pati sagu

A.4.1 Prinsip

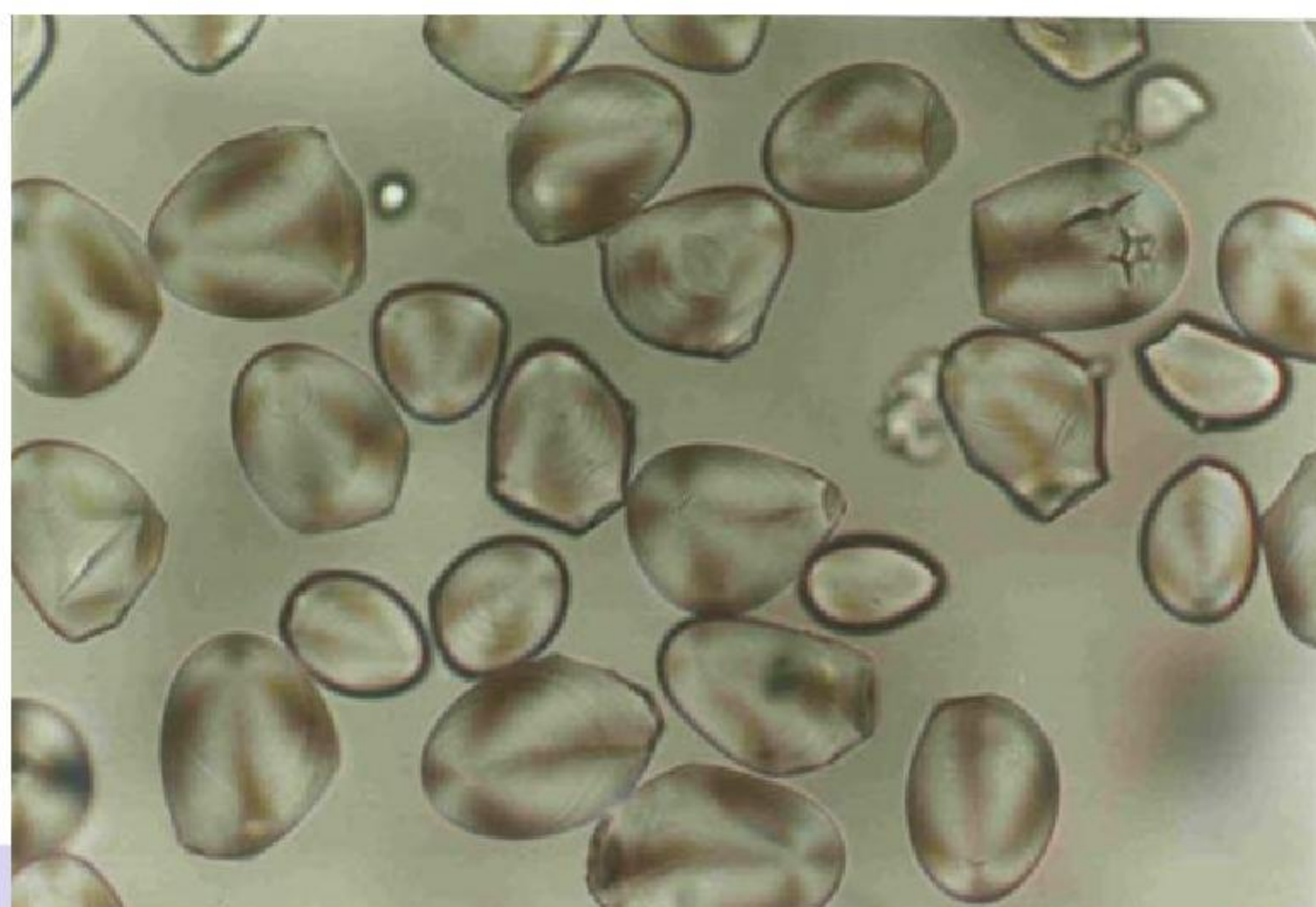
Membandingkan bentuk granula pati tepung contoh dengan bentuk granula pati sagu.

A.4.2 Peralatan

- Kaca obyek
- Kaca penutup
- Mikroskop

A.4.3 Cara kerja

- Taburkan sedikit contoh pada kaca obyek.
- Tambahkan sedikit air dan ratakan.
- Tutup dengan kaca penutup dan amati dengan mikroskop pada pembesaran 400 kali.
- Bandingkan bentuk granula pati tepung contoh dengan bentuk granula pati sagu (Gambar A.1). Adanya bentuk granula pati tepung lain selain pati sagu menandakan contoh tersebut dicampur dengan pati tepung lain.



Gambar A.1 - Pati sagu (*metroxylon sp*) pada pembesaran 400 kali

A.5 Kehalusan

A.5.1 Prinsip

Pengukuran derajat kehalusan dari contoh dengan menggunakan ayakan ukuran 100 mesh.

A.5.2 Peralatan

- Alat penggoyang ayakan.
- Ayakan dan piring/penampung berdiameter 8 inci dengan ukuran 100 mesh (150 μ m).
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 g.

A.5.3 Cara kerja

- Timbang 50 g \pm 0,1 g contoh (W_1), masukkan ke dalam ayakan yang dipasang pada alat pengoyang, dan goyangkan selama 5 menit.
- Timbang bagian yang tertinggal dalam ayakan (W_2).

A.5.4 Perhitungan

$$\text{Kehalusan (\%)} = 100 - \left(\frac{W_2}{W_1} \times 100 \right)$$

dengan:

W_1 adalah berat contoh, (g);

W_2 adalah berat bagian yang tertinggal dalam ayakan, (g).

SNI 3729:2008

A.6 Kadar Air

A. 6.1 Acuan

AOAC Official Method, 2000 925.10. Determination solid (total) and moisture in flour

A.6.2 Prinsip

Kehilangan berat yang terjadi pada pemanasan dalam oven dengan suhu 130 °C selama 1 jam.

A.6.3 Peralatan

- Eksikator yang berisi desika;
- Botol timbang alumunium dengan penutup Ø 5 cm, tinggi 3 cm;
- Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik, terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;

A.6.4 Cara kerja

- Panaskan botol timbang beserta tutupnya dengan oven pada suhu 130 °C ± 3 °C selama satu jam, dinginkan dalam eksikator selama 30 menit dan ditimbang (W_1).
- Timbang 2 g contoh ke dalam botol timbang (W).
- Panaskan botol timbang dalam keadaan terbuka dalam oven pada suhu 130 °C ± 3 °C selama satu jam (satu jam setelah suhu oven 130 °C).
- Tutup botol timbang ketika masih di dalam oven, kemudian pindahkan ke dalam eksikator, dinginkan selama 30 menit dan timbang (W_2).
- Lakukan duplo.
- Hitung kadar air dalam contoh.

A.6.5 Perhitungan

$$\text{Kadar air} = \frac{W_2 - W_1}{W} \times 100\%$$

dengan:

W adalah bobot contoh (g);

W_1 adalah bobot cawan kosong (g);

W_2 adalah bobot cawan kosong dan bahan kering (g).

A.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar air atau deviasi (RSD) maksimal 2 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau deviasi lebih besar dari 2 % analisis harus diulang kembali.

A.7 Kadar abu

A.7.1 Acuan

AOAC Official Method, 2000 923.03. Determination ash of flour

A.7.2 Prinsip

Pengabuan contoh dalam tanur pada suhu 550 °C, zat-zat organik diuraikan menjadi air dan CO₂, sedangkan zat-zat anorganik yang tertinggal dihitung sebagai kadar abu.

A.7.3 Peralatan

- Eksikator yang berisi desikan;
- Cawan porselin, kuarsa atau platina dengan volume 30 ml sampai 50 ml;
- Tanur listrik, terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.

A.7.4 Cara kerja

- Pijarkan cawan di dalam tanur listrik pada suhu 550 °C ± 10 °C, yang sebelumnya dipanaskan dahulu pada penangas listrik/bunsen dengan nyala api kecil selama 1 jam.
- Dinginkan dalam eksikator selama 1 jam, kemudian timbang (W₁).
- Timbang 3 g – 5 g contoh (W).
- Arangkan di atas penangas listrik/bunsen dengan nyala api kecil.
- Abukan dalam tanur pada suhu 550 °C ± 10 °C sampai putih atau kelabu selama 5 jam – 8 jam.
- Dinginkan dalam eksikator selama 30 menit dan timbang (W₂).
- Masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu yang sama selama 1 jam, dinginkan dalam eksikator dengan waktu yang sama dan timbang.
- Ulangi seperti pada butir g sampai diperoleh bobot tetap (selisih penimbangan yang terakhir dan yang sebelumnya maksimum 1 mg (W₂)).
- Lakukan duplo.
- Hitung kadar abu dalam contoh.

A.7.5 Perhitungan

$$\text{Kadar abu} = \frac{W_2 - W_1}{W} \times 100\%$$

dengan;

W adalah bobot contoh (g);

W₁ adalah bobot cawan kosong (g);

W₂ adalah bobot cawan kosong dan abu (g).

A.7.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar abu atau deviasi (*RSD*) maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau *RSD* lebih besar dari 3 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.8 Kadar pati

A.8.1 Prinsip

Hidrolisis pati menjadi monosakarida yang dapat mereduksikan Cu²⁺ menjadi Cu¹⁺. Kelebihan Cu²⁺ dapat dititar secara Yodimetri.

A.8.2 Peralatan

- a. Neraca analitik;
- b. Erlenmeyer 500 ml;
- c. Pendingin tegak;
- d. Labu ukur 500 ml;
- e. Corong;
- f. Pipet gondok 10 ml, 25 ml;
- g. Pemanas listrik;
- h. *Stop watch*;
- i. Gelas ukur;
- j. Buret;
- k. Pipet tetes.

A.8.3 Pereaksi

- a. Asam klorida, HCl 3%;
- b. Natrium hidroksida, NaOH 30%;
- c. Kertas lakmus;
- d. Asam asetat pekat;
- e. Indikator fenolftalein (pp);
- f. Larutan Luff-Schoorl;

Pembuatan pereaksi Luff-Schoorl

1. Larutkan 143,8 g Na_2CO_3 anhidrat dalam kira-kira 300 ml air suling. Sambil diaduk, tambahkan 50 g asam sitrat yang telah dilarutkan dengan 50 ml air suling.
 2. Tambahkan 25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang telah dilarutkan dengan 100 ml air suling. Pindahkan larutan tersebut ke dalam labu 1 liter, tepatkan sampai tanda garis dengan air suling dan kocok.
 3. Biarkan semalam dan saring bila perlu. Larutan ini mempunyai kepekatan Cu^{2+} 0,1 N.
- g. Larutan kalium iodida, KI 20% ;
 - h. Larutan asam sulfat, H_2SO_4 25% ;
 - i. Larutan natrium tio sulfat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,1 N ;
 - j. Penunjuk larutan kanji 0,5%.

A.8.4 Pengujian kepekatan larutan Luff-Schoorl

- a. Pipet 25 ml larutan Luff-Schoorl, tambahkan 25 ml larutan H_2SO_4 6 N dan 3 g KI. Titar dengan larutan natrium thio sulfat 0,1 N dengan penunjuk larutan kanji 0,5%. Larutan natrium tio sulfat yang dipergunakan untuk titrasi 25 ml \pm 2 ml.
- b. Pipet 10 ml larutan Luff-Schoorl, masukkan ke dalam labu ukur 100 ml, encerkan dengan air suling dan kocok.
Pipet 10 ml larutan hasil pengenceran tersebut dan masukkan ke dalam erlenmeyer berisi 25 ml HCl 0,1 N.
Masukkan erlenmeyer tersebut dalam penangas air mendidih dan biarkan selama 1 jam, kemudian angkat dan dinginkan.
Encerkan dengan air suling dan titar dengan larutan NaOH 0,1 N dengan indikator fenolftalein.
- c. Hitung volume HCl yang diperlukan. Larutan HCl 0,1 M yang dipergunakan untuk titrasi harus sekitar 6,0 ml sampai 7,6 ml
- d. Larutan Luff-Schoorl harus mempunyai pH 9,3 – 9,4.

A.8.5 Cara kerja

- Timbang seksama lebih kurang 5 g contoh ke dalam erlenmeyer 500 ml.
- Tambahkan 200 ml larutan HCl 3 %, didihkan selama 3 jam dengan pendingin tegak.
- Dinginkan dan netralkan dengan larutan NaOH 30 % (cek dengan kertas lakmus atau indikator fenolftalein), dan tambahkan sedikit CH₃COOH 3 % agar suasana larutan agak sedikit asam.
- Pindahkan isinya ke dalam labu ukur 500 ml dan impitkan hingga tanda garis, kemudian saring.
- Pipet 10 ml saringan ke dalam erlenmeyer 500 ml, tambahkan 25 ml larutan Luff-Schoorl (dengan pipet) dan beberapa butir batu didih serta 15 ml air suling.
- Panaskan campuran tersebut dengan nyala yang tetap. Usahakan agar larutan dapat mendidih dalam waktu 3 menit (gunakan *stopwatch*), didihkan terus selama tepat 10 menit (dihitung dari saat mulai mendidih dan gunakan *stopwatch*), kemudian dengan cepat dinginkan dalam bak berisi es.
- Setelah dingin, tambahkan 25 ml H₂SO₄ 25 % perlahan-lahan dan 15 ml larutan KI 20 %.
- Titrat secepatnya dengan larutan natrium tiosulfat 0,1 N (gunakan penunjuk larutan kanji 0,5%).
- Kerjakan juga blanko.

A.8.6 Perhitungan

Untuk mencari ml natrium tiosulfat yang digunakan, maka hitung :

$$\frac{(\text{Volume blanko} - \text{volume penitar}) \times N_{\text{tio}}}{0,1}$$

Kemudian lihat dalam daftar Luff-Schoorl berapa mg gula yang terkandung untuk ml natrium tiosulfat yang dipergunakan.

$$\text{Kadar glukosa} = \frac{b \times fp}{W} \times 100 \%$$

$$\text{Kadar pati} = 0,90 \times \text{kadar glukosa}$$

dengan:

W adalah bobot contoh (mg);

b adalah glukosa yang terkandung untuk ml thio yang dipergunakan (mg), dari Tabel A.1;

fp adalah faktor pengenceran.

Tabel A.1 - Penetapan gula menurut Luff-Schoorl

| Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 N (ml) | Glukosa, fruktosa, gula inverse (mg) | Laktosa (mg) | Maltosa (mg) |
|---|---|-----------------|-----------------|
| 1 | 2,4 | 3,6 | 3,9 |
| 2 | 4,8 | 7,3 | 7,8 |
| 3 | 7,2 | 11,0 | 11,7 |
| 4 | 9,7 | 14,7 | 15,6 |
| 5 | 12,2 | 18,4 | 19,6 |
| 6 | 14,7 | 22,1 | 23,5 |
| 7 | 17,2 | 25,8 | 27,5 |
| 8 | 19,8 | 29,5 | 31,5 |
| 9 | 22,4 | 33,2 | 35,5 |
| 10 | 25,0 | 37,0 | 39,5 |
| 11 | 27,6 | 40,8 | 43,5 |
| 12 | 30,3 | 44,6 | 47,5 |
| 13 | 33,0 | 48,4 | 51,6 |
| 14 | 35,7 | 52,2 | 55,7 |
| 15 | 38,5 | 56,0 | 59,8 |
| 16 | 41,3 | 59,9 | 63,9 |
| 17 | 44,2 | 63,8 | 68,0 |
| 18 | 47,1 | 67,7 | 72,2 |
| 19 | 50,0 | 71,1 | 76,5 |
| 20 | 53,0 | 75,1 | 80,9 |
| 21 | 56,0 | 79,8 | 85,4 |
| 22 | 59,1 | 83,9 | 90,0 |
| 23 | 62,2 | 88,0 | 94,6 |

A.9 Kadar serat kasar

A.9.1 Prinsip

Ekstraksi contoh dengan asam dan basa untuk memisahkan serat kasar dari bahan lain.

A.9.2 Peralatan

- Neraca analitik
- Pendingin
- Corong *buchner*
- Pompa vakum

A.9.3 Pereaksi

- Asam sulfat, H₂SO₄ 1,25 %;
- Natrium hidroksida, NaOH 3,25 %;
- Etanol 96%;
- Kertas saring Whatman 54, 541 atau 41.

A.9.4 Cara kerja

- Timbang seksama 2 g – 4 g contoh (W). Bebaskan lemaknya dengan cara ekstraksi dengan cara soxhlet atau dengan cara mengaduk-mengendap-tuangkan contoh dalam pelarut organik sebanyak 3 kali. Keringkan contoh dan masukkan ke dalam erlenmeyer

- 500 ml.
- Tambahkan 50 ml larutan H_2SO_4 1,25 %, kemudian dididihkan selama 30 menit dengan menggunakan pendingin tegak.
 - Tambahkan 50 ml NaOH 3,25 % dan dididihkan lagi selama 30 menit.
 - Dalam keadaan panas, saring dengan corong *buchner* yang berisi kertas saring tak berabu Whatman 54, 41 atau 541 yang telah dikeringkan dan diketahui bobotnya.
 - Cuci endapan yang terdapat pada kertas saring berturut-turut dengan H_2SO_4 1,25 % panas, air panas dan etanol 96 %.
 - Angkat kertas saring beserta isinya, masukkan ke dalam kotak timbang yang telah diketahui bobotnya, keringkan pada suhu 105°C , dinginkan dan timbang sampai bobot tetap (W_1). Setelah ditimbang dihitung dengan rumus a, jika berat lebih besar dari 1 % maka buka kertas saring beserta isinya, timbang sampai bobot tetap (W_2).

A.9.5 Perhitungan

- Serat kasar $\leq 1\%$

$$\% \text{ serat kasar} = \frac{W_1}{W} \times 100 \%$$

- Serat kasar $> 1\%$

$$\% \text{ serat kasar} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100 \%$$

dengan:

W adalah bobot contoh (g);

W_1 adalah bobot endapan pada kertas saring (g);

W_2 adalah bobot abu (g).

CATATAN 1 Kehalusan partikel contoh harus diperhatikan, disarankan contoh yang halus tersebut dapat lolos ayakan lebih kurang 1 mm^2 .

CATATAN 2 Pembebasan lemak dari contoh dapat diabaikan bila jumlah lemak dalam contoh tersebut rendah.

A.10 Derajat asam

A.10.1 Prinsip

Pelarutan asam organik dalam contoh dengan menggunakan pelarut organik tertentu (alkohol 95 % netral) dilanjutkan dengan penitrasi dengan basa (NaOH atau KOH).

A.10.2 Peralatan

- Neraca analitik ketelitian minimal 0,1 mg, terkalibrasi;
- Erlenmeyer 250 ml, terkalibrasi;
- Buret 10 ml atau 50 ml, terkalibrasi.

A.10.3 Pereaksi

- Larutan alkohol 95 % netral
Masukkan alkohol 95 % sebanyak yang diperlukan ke dalam erlenmeyer, tetesi dengan

SNI 3729:2008

beberapa tetes indikator fenolftalein kemudian dititrasasi dengan larutan standar NaOH 0,1 N sampai terbentuk warna merah muda.

- b. Indikator fenolftalein (PP) 0,5 %
Larutkan 0,5 gram fenolftalein dalam 100 ml etanol 95 %.
- c. Larutan standar NaOH 0,1 N
 - Pembuatan larutan NaOH 50 % (larutan Sorensen)
Larutkan 100 gram NaOH dalam air suling bebas CO₂ sebanyak 100 ml.
 - Pembuatan larutan standar NaOH 0,1 N
Larutkan 5,26 ml NaOH 50 % (19 N) ke dalam labu ukur 1000 ml dan ditera sampai tanda garis dengan air suling bebas CO₂. Tetapkan normalitas larutan tersebut.

A.10.4 Cara kerja

A.10.4.1 Cara pertama

- a. Timbang dengan seksama 20 gram contoh ke dalam erlenmeyer 250 ml.
- b. Tambahkan 50 ml etanol 95 % netral.
- c. Tambahkan 3 tetes – 5 tetes indikator PP dan titar dengan standar NaOH 0,1 N hingga warna merah muda tetap (tidak berubah selama 15 detik).
- d. Lakukan penetapan duplo.
- e. Hitung derajat asam dalam contoh.

A.10.4.2 Cara kedua

- a. Timbang sejumlah contoh berdasarkan perkiraan bilangan asam dalam contoh tersebut (lihat Tabel A.2), dan masukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml.
- b. Tambahkan 150 ml campuran etanol 95 % v/v dan dietil eter (1:1 v/v) dan larutkan dengan cara menggoyangkan erlenmeyer.
- c. Tambahkan 3 tetes – 5 tetes indikator PP dan titar dengan larutan NaOH 0,1 N hingga warna merah muda tetap (tidak berubah selama 15 detik). Lakukan penetapan duplo
- d. Hitung derajat asam dalam contoh.

Tabel A.2 - Bobot contoh berdasarkan perkiraan bilangan asam dari contoh

| Perkiraan bilangan keasaman | Bobot penimbangan (g) | Ketelitian penimbangan (g) |
|-----------------------------|-----------------------|----------------------------|
| 1 | 20 | 0,50 |
| 1 – 4 | 20 | 0,20 |
| 4 – 15 | 2,5 | 0,01 |
| 15 – 75 | 0,5 | 0,001 |
| > 75 | 0,1 | 0,0002 |
| 15 – 75 | 0,5 | 0,001 |
| > 75 | 0,1 | 0,0002 |

A.10.6 Perhitungan

Derajat asam dinyatakan sebagai miliekivalen/100 g lemak (sebaiknya penulisan disesuaikan dengan tabel persyaratan ml NaOH/100 g lemak), dihitung sampai 2 (dua) desimal dengan menggunakan rumus:

$$\text{Derajat asam (ml NaOH 1 N/100g)} = \frac{100 \times V \times T}{m}$$

dengan:

V adalah volume NaOH yang diperlukan dalam penitrasi contoh (ml);

T adalah normalitas NaOH;

m adalah bobot contoh (g).

A.11 Residu SO₂

A.11.1 Metode titrasi

A.11.1.1 Peralatan

- Neraca analitik;
- Labu destilasi;
- Gelas ukur;
- Buret;
- Botol timbang;
- Alat destilasi.

A.11.1.2 Pereaksi

- Asam fosfat, H₃PO₄ 88 % (d = 1,75)
- Larutan H₂O₂ 0,2 % (b/v)
Larutkan 0,7 ml H₂O₂ ke dalam 100 ml. Dibuat baru setiap akan digunakan/harus selalu segar.
- Larutan Natrium hidroksida, NaOH 0,01 N
Standardisasi dengan kalium hidrogen phtalat, yang telah dikeringkan pada 110 °C.
- Metanol, CH₃OH
- Larutan campuran indikator.
Campurkan 50 ml larutan merah metil 0,03 % dalam alkohol dan 50 ml larutan metilena biru 0,05% dalam alkohol, kemudian saring.

A.11.1.3 Cara kerja

- Timbang sejumlah contoh ke dalam labu destilasi. Sebagai petunjuk dapat dilihat pada Tabel A.3.

Tabel A.3 - Jumlah contoh dan volume air suling untuk pengujian residu SO₂

| Kandungan SO ₂ (mg/kg) | Sejumlah contoh untuk /yang ditimbang (g/ml) | Volume air suling yang ditambahkan (ml) |
|--------------------------------------|---|--|
| < 10 | 40 – 50 | 20 |
| 10 – 100 | 20 – 25 | 30 |
| > 100 | 5 – 10 | 40 |

- b. Tambahkan air suling ke dalam labu sesuai petunjuk. Tambahkan 50 ml metanol dan campurkan. Masukkan ke dalam penampung destilasi 10 ml larutan H_2O_2 , 60 ml air suling dan beberapa tetes campuran larutan indikator. Tambahkan beberapa tetes larutan NaOH 0,01 N sampai terbentuk warna hijau.
- c. Tambahkan sejumlah yang sama larutan H_2O_2 0,2 % yang sudah dinetralkan ke dalam botol pencuci.
- d. Hubungkan ke atas alat dan atur nitrogen mengalir kira-kira 60 gelembung per menit.
- e. Tambahkan 15 ml H_2PO_4 88 % ke dalam pipa/funnel dan alirkan ke dalam labu destilasi
- f. Panaskan dengan cepat untuk mendidihkan campuran dan kemudian biarkan mendidih selama 30 menit.
- g. Lepaskan penampung alat destilasi dan bilas pipa.
- h. Titar asam sulfat yang ada/terbentuk dengan larutan NaOH 0,01 N sampai warna berubah menjadi hijau.

A.11.1.4. Perhitungan

$$\text{SO}_2 \text{ yang terkandung (mg/kg atau mg/l)} = \frac{b \times c \times 32 \times 1000}{a}$$

dengan:

- a adalah bobot contoh (g) atau volume contoh (ml);
- b adalah volume larutan NaOH yang diperlukan untuk penitrasi (ml);
- c adalah normalitas larutan NaOH

A.11.2 Metode iodimetri

A.11.2.1 Peralatan

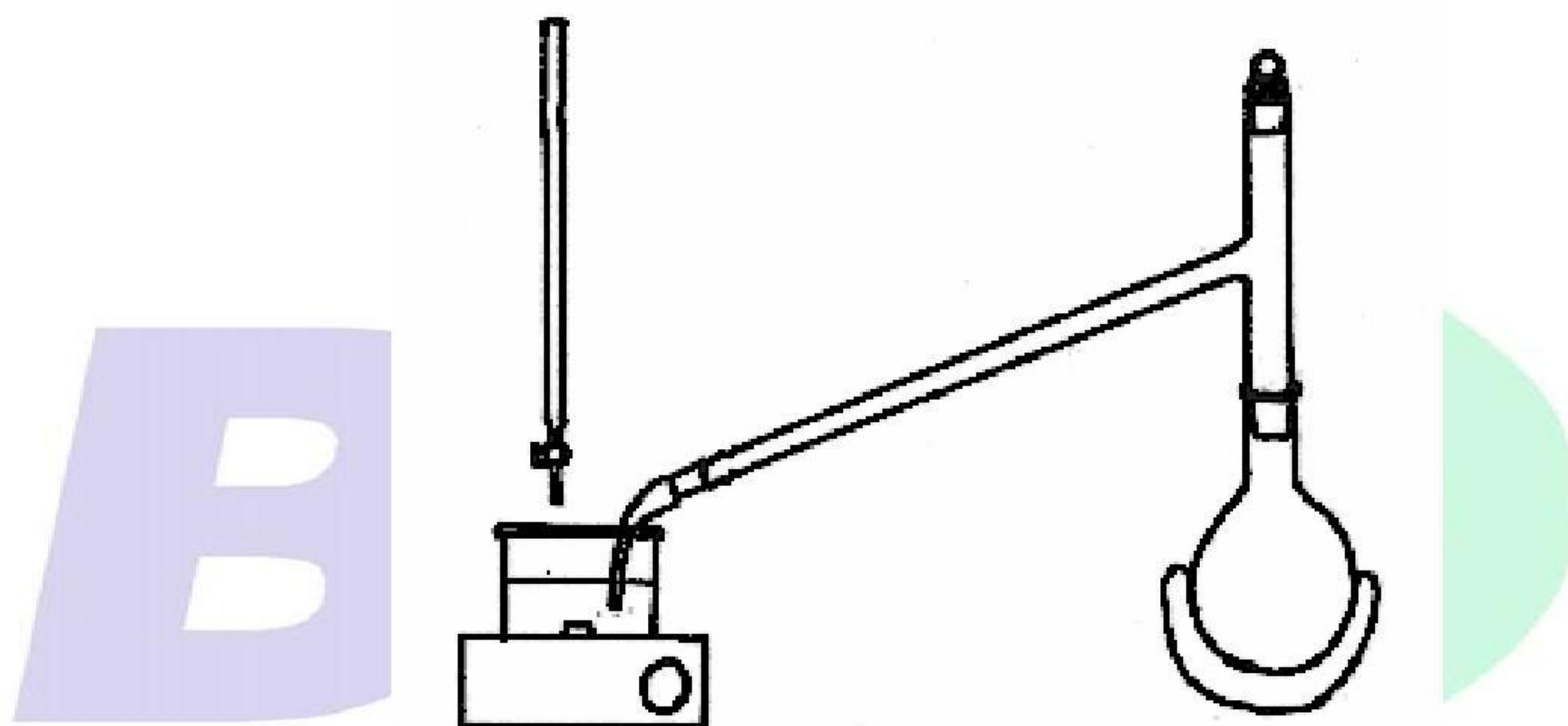
- a. Labu berdasar bulat;
- b. *Heating* mantel;
- c. Pendingin Liebig;
- d. Pengaduk listrik;
- e. Buret 10 ml.

A.11.2.2 Pereaksi

- a. Asam klorida, HCl 16 % b/v
Masukkan dengan hati-hati 160 ml HCl p.a. ke dalam labu ukur 1 l berisi 700 ml air, aduk dan encerkan sampai tanda garis, kocok.
- b. Larutan kalium iodida, KI 1 %
Larutkan 1,0 g KI ke dalam labu ukur 100 ml, encerkan dan tepatkan sampai tanda garis dengan air suling.
- c. Indikator kanji 2 %
Tambahkan air panas secukupnya ke dalam 20 g pati sambil diaduk sampai membentuk pasta, pindahkan sambil diaduk ke dalam air mendidih, jadikan 1 l, simpan dalam lemari es. Larutan indikator ini diperbaharui setiap 1 bulan.
- d. Larutan iodium, I 0,1 N
Larutkan 18,0 g KI dan 6,5 g I dalam labu ukur 500 ml yang mengandung 400 ml H_2O , aduk dan encerkan sampai tanda garis.
- e. Larutan iodium, I 0,02 N
Pipet 20,0 ml I 0,1 N, masukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan sampai tanda garis dengan air suling, standardisasikan.

A.11.2.3 Cara kerja

- Pasang rangkaian alat destilasi seperti pada Gambar A.2.
- Timbang seksama lebih kurang 10 g contoh, masukkan ke dalam labu didih berdasar bulat 1 l, tambahkan 100 ml air dan beberapa butir batu didih.
- Letakkan gelas 250 ml berisi 75 ml air, 1 ml larutan indikator kanji 2 %, 4 tetes – 5 tetes larutan KI 1% di bawah alat pendingin. Ujung pipa pendingin harus terendam dalam cairan dalam pipa penampung.
- Buka sumbat labu didih, kemudian masukkan segera 200 ml HCl 16 % dengan bantuan corong bertangkai panjang.
- Tutup labu didih dengan segera dan panaskan.
- Masukkan larutan I₂ yang telah distandardisasi ke dalam buret, impitkan.
- Penyulingan dilakukan selama 9 menit dan tunggu 30 detik – 45 detik untuk meyakinkan telah tercapainya titik akhir.
- Catat jumlah larutan I₂ 0,02 N yang dipergunakan pada penitaran.



Gambar A.2 - Peralatan destilasi standar untuk analisis SO₂

A.11.2.4 Perhitungan

$$\text{SO}_2 = \frac{V \times N \times 32 \times 1000}{W} \text{ mg/kg}$$

dengan:

W adalah berat contoh (g);

V adalah jumlah larutan I₂ 0,02 N yang dipergunakan pada penitaran (ml);

N adalah normalitas larutan I.

A.12 Cemarkan logam

A.12.1 Penetapan cemarkan logam Pb dan Cu

A.12.1.1 Acuan

AOAC Official Method, 2000 999.11. Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron and Zinc in Foods. AAS Method after Dry Ashing.

A.12.1.2 Prinsip

Peleburan contoh dengan cara pengabuan kering, dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Kemudian absorben dibaca menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) atau *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS).

A.12.1.3 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Cawan porselen/platina/kuarsa dengan kapasitas 50 ml – 100 ml;
- Penangas listrik;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- SSA terkalibrasi dengan lampu katoda Pb dan Cu;
- Pipet ukur berskala 0,1 kapasitas 5 ml dan 10 ml;
- Labu ukur 50 ml, 100 ml dan 1000 ml, terkalibrasi;
- Gelas ukur kapasitas 10 ml;
- Penangas air.

A.12.1.4 Pereaksi

- Larutan HNO_3 0,1 N (larutkan 7 ml HNO_3 65 %, encerkan menjadi 1 l dengan air suling)
- Larutan HCl 6N (larutkan 500 ml HCl 37 %, encerkan menjadi 1 l dengan air suling)
- Larutan baku Pb dan Cu 1000 $\mu\text{g/ml}$
- Larutan HNO_3 pekat (65 %, BJ 1,4)
- Larutan HCl pekat (37 %, BJ 1,19)
- Kertas Whatman no. 41
- Larutan baku kerja Pb
 - Pipet 10,0 ml larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Pb ke dalam labu ukur 100 ml terpisah, encerkan dan tepatkan volume dengan larutan HNO_3 0,1 N. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 100 $\mu\text{g/ml}$.
 - Pipet masing-masing 1 ml, 2 ml, 4 ml, 6 ml dan 8 ml larutan baku 100 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam labu ukur 100 ml terpisah, kemudian encerkan dan tepatkan volumenya dengan larutan HNO_3 0,1 N. Larutan baku akhir ini memiliki konsentrasi 1,0 $\mu\text{g/ml}$; 2,0 $\mu\text{g/ml}$; 4,0 $\mu\text{g/ml}$; 6,0 $\mu\text{g/ml}$ dan 8,0 $\mu\text{g/ml}$ Pb.
- Larutan baku Cu

Sediakan larutan baku Cu 1000 $\mu\text{g/ml}$. Larutkan 1,000 g Cu dalam 7 ml HNO_3 pekat, kemudian masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml, encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Atau bisa digunakan larutan baku kerja Cu 1000 $\mu\text{g/ml}$ siap pakai.
- Larutan baku kerja Cu

Pipet 10,0 ml larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam labu ukur 100 ml. Encerkan dan tepatkan volume dengan larutan HNO_3 0,1 N dan kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ Cu. Pipet masing-masing 0,25 ml ; 0,5 ml ; 1 ml ; 2 ml dan 4 ml larutan baku kedua ke dalam labu ukur 100 ml terpisah, kemudian encerkan tepatkan volume dengan larutan HNO_3 0,1 N. Larutan akhir baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,25 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$; 1,0 $\mu\text{g/ml}$; 2,0 $\mu\text{g/ml}$ dan 4,0 $\mu\text{g/ml}$ Cu.

A.12.1.5 Cara kerja

- Timbang dengan teliti 5 g contoh dalam cawan porselen/platina/kuarsa.
- Tempatkan cawan berisi contoh di atas penangas listrik, kemudian panaskan secara bertahap sampai contoh terbakar dan tidak berasap lagi.
- Lanjutkan pengabuan dalam tanur 500 °C sampai abu berwarna putih bebas dari karbon
- Apabila abu masih terdapat sisa karbon, ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan abu dengan beberapa tetes air diikuti penambahan HNO_3 pekat, tetes demi tetes kira-kira

- 0,5 ml - 3 ml.
- Keringkan cawan di atas penangas listrik, dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 500°C, lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO₃ pekat, bisa diulangi bila abu masih berwarna keabu-abuan.
 - Larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air selama 2 menit sampai 3 menit.
 - Saring larutan melalui kertas saring Whatman no. 41 ke dalam labu ukur 50 ml.
 - Cuci residu dengan 5 ml HNO₃ 0,1 N, saring dan satukan filtrat ke dalam labu ukur 50 ml. Encerkan dan tepatkan sampai tanda garis dengan larutan HNO₃ 0,1 N.
 - Buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan seperti contoh.
 - Baca absorben larutan baku kerja, larutan contoh dan larutan blanko dengan alat SSA pada panjang gelombang 283,3 nm untuk Pb, dan 324,7 nm untuk Cu.
 - Buat kurva kalibrasi dengan sumbu y sebagai absorben dan sumbu x sebagai konsentrasi (dalam µg/ml). Plot hasil pembacaan contoh pada kurva kalibrasi.
 - Hitung kandungan logam dalam contoh.

A.12.1.6 Perhitungan

$$\text{Kadar logam (mg/kg)} = \frac{F \times b}{m}$$

dengan:

F adalah faktor pengenceran;

b adalah µg/ml dari kurva kalibrasi larutan deret baku Pb/Cu;

m adalah berat contoh (g).

A.12.2 Penetapan cemaran logam raksa (Hg)

A.12.2.1 Prinsip

Mereaksikan senyawa raksa dengan NaBH₄ dalam keadaan asam guna membentuk gas atomik Hg dan diikuti dengan pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala dengan panjang gelombang 253,7 nm.

A.12.2.2 Pereaksi

- Larutan pereduksi
 - Larutan NaBH₄
Larutkan 3 g serbuk NaBH₄ dan 3 g NaOH dalam air suling dalam labu ukur 500 ml.
- Larutan pengencer
Tambahkan 58 ml HNO₃ dan 67 ml H₂SO₄ ke dalam labu ukur 1 liter yang mengandung 300 ml – 500 ml air suling, tepatkan sampai tanda garis dengan air suling, dan kocok.
- Larutan baku raksa
 - Larutan baku 1000 mg/l
Larutkan 0,1354 g HgCl₂ dalam 100,0 ml air suling.
 - Larutan kerja 1 mg Hg/l
Encerkan 1 ml larutan baku 1000 mg/l dalam 1 liter H₂SO₄ (larutan pengencer). Larutan kerja ini harus dibuat langsung sebelum digunakan.
 - Larutan baku yang mempunyai konsentrasi akhir 0 µg Hg/ml; 0,0025 µg Hg/ml; 0,005 µg Hg/ml; 0,01 µg Hg/ml; 0,02 µg Hg/ml.
- H₂SO₄ 18 N
- HNO₃ 7 N
- Batu didih
- Campuran HNO₃ : HClO₄ (1:1)

- h. H_2O_2
- i. Larutan natrium molibdat 2 %

A.12.2.3 Peralatan

- a. Spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi dengan lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (*Hydride Vaporiser Generator/HVG*);
- b. Labu destruksi 250 ml berdasar bulat kapasitas 250 ml;
- c. Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm – 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, kemudian dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- d. Labu ukur 25 ml, 100 ml, 500 ml dan 1000 ml terkalibrasi;
- e. Penangas listrik.

A.12.2.4 Cara kerja

A.12.2.4.1 Pengabuan basah

- a. Timbang 5 g contoh ke dalam labu destruksi, tambah 25 ml H_2SO_4 18 N, 20 ml HNO_3 7 N, 1 ml larutan natrium molibdat 2 % dan 5 – 6 batu didih.
- b. Hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit.
- c. Tambah 20 ml HNO_3 (1:1) melalui pendingin.
- d. Hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit, kemudian dinginkan.
- e. Dengan hati-hati tambahkan 10 ml air melalui pendingin sambil labu digoyang-goyangkan.
- f. Didihkan lagi selama 10 menit.
- g. Matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 3 kali 15 ml air suling, dinginkan sampai suhu kamar.
- h. Secara kuantitatif, pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 ml, encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i. Kerjakan blanko dengan pemakaian pereaksi seperti yang digunakan pada contoh.
- j. Siapkan deret baku dengan konsentrasi akhir 0 $\mu\text{g/ml}$; 0,0025 $\mu\text{g/ml}$; 0,005 $\mu\text{g/ml}$; 0,01 $\mu\text{g/ml}$ dan 0,02 $\mu\text{g/ml}$ Hg.
- k. Siapkan larutan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan petunjuk alat.
- l. Baca absorben larutan deret baku, larutan destruksi dan larutan blanko dengan menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm.
- m. Buat kurva kalibrasi dengan sumbu y sebagai absorben dan sumbu x sebagai konsentrasi dalam mg/kg dari pembacaan deret larutan baku kerja.
- n. Hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.12.2.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* dengan sistim tertutup

- a. Timbang 0,5 g - 1 g contoh ke dalam tabung destruksi, tambah 4 ml HNO_3 dan 1 ml H_2O_2 tutup rapat dan masukkan ke dalam *microwave*. Kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat.
- b. Secara kuantitatif, pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 25 ml, encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- c. Kerjakan blanko dengan pemakaian pereaksi seperti yang digunakan pada contoh.
- d. Siapkan deret baku dengan konsentrasi akhir 0 $\mu\text{g/ml}$; 0,0025 $\mu\text{g/ml}$; 0,005 $\mu\text{g/ml}$; 0,01 $\mu\text{g/ml}$ dan 0,02 $\mu\text{g/ml}$ Hg.
- e. Tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan deret baku, larutan destruksi, dan larutan

- blanko pada alat "HVG".
- Baca absorben larutan deret baku, larutan contoh dan larutan blanko dengan menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm.
 - Buat kurva kalibrasi dengan sumbu y sebagai absorben dan sumbu x sebagai konsentrasi dalam mg/kg dari pembacaan deret larutan baku kerja.
 - Hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.12.2.5 Perhitungan

$$\text{Kadar Hg (mg/kg)} = \frac{F \times b}{m}$$

dengan:

F adalah faktor pengenceran;

b adalah $\mu\text{g/ml}$ dari kurva kalibrasi larutan deret baku Hg;

m adalah berat contoh (g).

A.13 Cemarkan arsen

A.13.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang 193,7 nm.

A.13.2 Peralatan

- Spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG").
- Labu destruksi 250 ml berdasar bulat kapasitas 250 ml.
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm – 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, kemudian dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm.
- Labu ukur 25 ml, 25 ml, 100 ml, 500 ml dan 1000 ml terkalibrasi.
- Penangas listrik.

A.13.3 Pereaksi

- Natrium boronhidrida
Larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dalam 500 ml air suling.
- Asam klorida 8 M
Encerkan 66 ml HCl 37 % hingga 100 ml air suling.
- Timah (II) klorida 10 %
Timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas piala 200 ml. Tambah 100 ml HCl 37%. Panaskan hingga larutan jernih. Dinginkan, kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 ml dan impitkan dengan air suling.
- Kalium iodida 20 %
Timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 ml, dan impitkan dengan air suling (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- Larutan baku induk arsen 1000 mg/l
Larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dalam NaOH 20%, kemudian netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:3 (1 bagian asam: 3 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 liter, dan

- impitkan dengan air suling.
- f. Larutan baku arsen 100 mg/l
Pipet 10 ml larutan baku induk arsen 1000 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml, dan impitkan dengan air suling.
- g. Larutan baku arsen 1 mg/l (1 µg/ml)
Pipet 1 ml larutan baku arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml, dan impitkan dengan air suling.
- h. Larutan deret baku arsen 0,01 µg/ml; 0,02 µg/ml; 0,03 µg/ml; 0,04 µg/ml; 0,05 µg/ml
Pipet 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml; dan 2,5 ml larutan baku arsen 1 µg/ml ke dalam labu 50 ml, dan impitkan dengan air suling (larutan harus dibuat baru).
- i. HNO₃ pekat.
- j. HClO₄ pekat.

A.13.4 Persiapan contoh

A.13.4.1 Pengabuan basah

- a. Timbang 5 g contoh dalam labu destruksi dan tambahkan tambah 20 ml H₂SO₄ p.a. dan 15 ml HNO₃ p.a.
- b. Setelah reaksi selesai, panaskan dan tambah lagi HNO₃ pekat sedikit demi sedikit hingga contoh berwarna coklat atau kehitaman.
- c. Tambah 10 ml HClO₄ sedikit demi sedikit, panaskan lagi hingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO₃ p.a.).
- d. Pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml dan impitkan dengan air suling.

A.13.4.2 Pengabuan kering

- a. Timbang 5 g contoh dalam cawan, tambah 2,5 g Mg(NO₃)₂·2H₂O dan 25 ml HNO₃ pekat.
- b. Aduk dengan sempurna dan uapkan di atas penangas listrik hingga kering.
- c. Arangkan dalam tanur 500 °C selama 2 jam. Basahkan dengan HNO₃ p.a. Uapkan lagi dan abukan lagi selama 1 jam pada 500°C sampai didapat abu berwarna putih.
- d. Larutkan dengan larutan HCl 1:3 dan impitkan hingga 50 ml dengan air suling.

A.13.4.3 Destruksi dengan *microwave* (sistem tertutup)

- a. Timbang 0,5 g - 1 g contoh ke dalam tabung destruksi, tambah 2 ml HNO₃ dan 1 ml H₂O₂., Tutup tabung dan masukkan ke dalam alat *microwave*.
- b. Kerjakan programnya sesuai dengan instruksi kerja alat.
- c. Setelah dingin, pindahkan secara kuantitatif larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 ml dan impitkan dengan air suling.

A.13.5 Cara kerja

- a. Siapkan NaBH₄ dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat.
- b. Pipet 25 ml larutan destruksi (dari persiapan contoh 13.3.5.1; 13.3.5.2 atau 13.3.5.3), tambahkan 2 ml HCl 8 M dan 0,1 ml KI 20 % kemudian biarkan minimal 2 menit.
- c. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat.
- d. Tuangkan deret baku arsen 0,01 µg/ml; 0,02 µg/ml; 0,03 µg/ml; 0,04 µg/ml; 0,05 µg/ml serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh.
- e. Baca nilai absorben tertinggi dari standar dan contoh dengan blanko sebagai koreksi.
- f. Buat kurva standar dengan sumbu y sebagai absorben dan sumbu x sebagai

- konsentrasi .
g. Hitung kandungan arsen dari contoh.

A.13.6 Perhitungan

$$\text{Kadar As (mg/kg)} = \frac{F \times b}{m}$$

dengan:

F adalah faktor pengenceran;

b adalah $\mu\text{g/ml}$ dari kurva kalibrasi larutan deret baku As;

m adalah berat contoh (g).

A.14 Cemarkan mikroba

A.14.1 Angka lempeng total (metode *plate count*)

A.14.1.1 Acuan

Bacteriological Analytical Manual, 2001, chapter 3.

A.14.1.2 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A.14.1.3 Peralatan

- Cawan petri dari gelas/plastik (90 mm – 100 mm) ;
- Pipet ukur (1,5 ml dan 10 ml);
- Penangas air $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- Lemari pengering (35 ± 1) $^{\circ}\text{C}$;
- Alat penghitung koloni (*colony counter*);
- Autoklaf;
- Alat sterilisasi kering (oven).

A.14.1.4 Pembenihan dan pengencer

- Larutan pengencer: Butterfield's phosphate-buffered*
Larutan stok buffer *Butterfield's fosfat* dari:

- | | |
|----------------------------|--------|
| – KH_2PO_4 | 34 g |
| – Air destilata | 500 ml |

Atur pH dengan NaOH sehingga pH 7,2, tepatkan volume sampai 1000 ml dengan air destilata. Sterilisasi pada suhu $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit. Simpan pada refrigerator.

Untuk membuat larutan pengencer 1,25 ml larutan stok diencerkan dengan air destilata sampai volume 1 l, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sebanyak 90 ml, atau 99 ml dan disterilisasi pada suhu $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit.

- Plate count agar (PCA)*

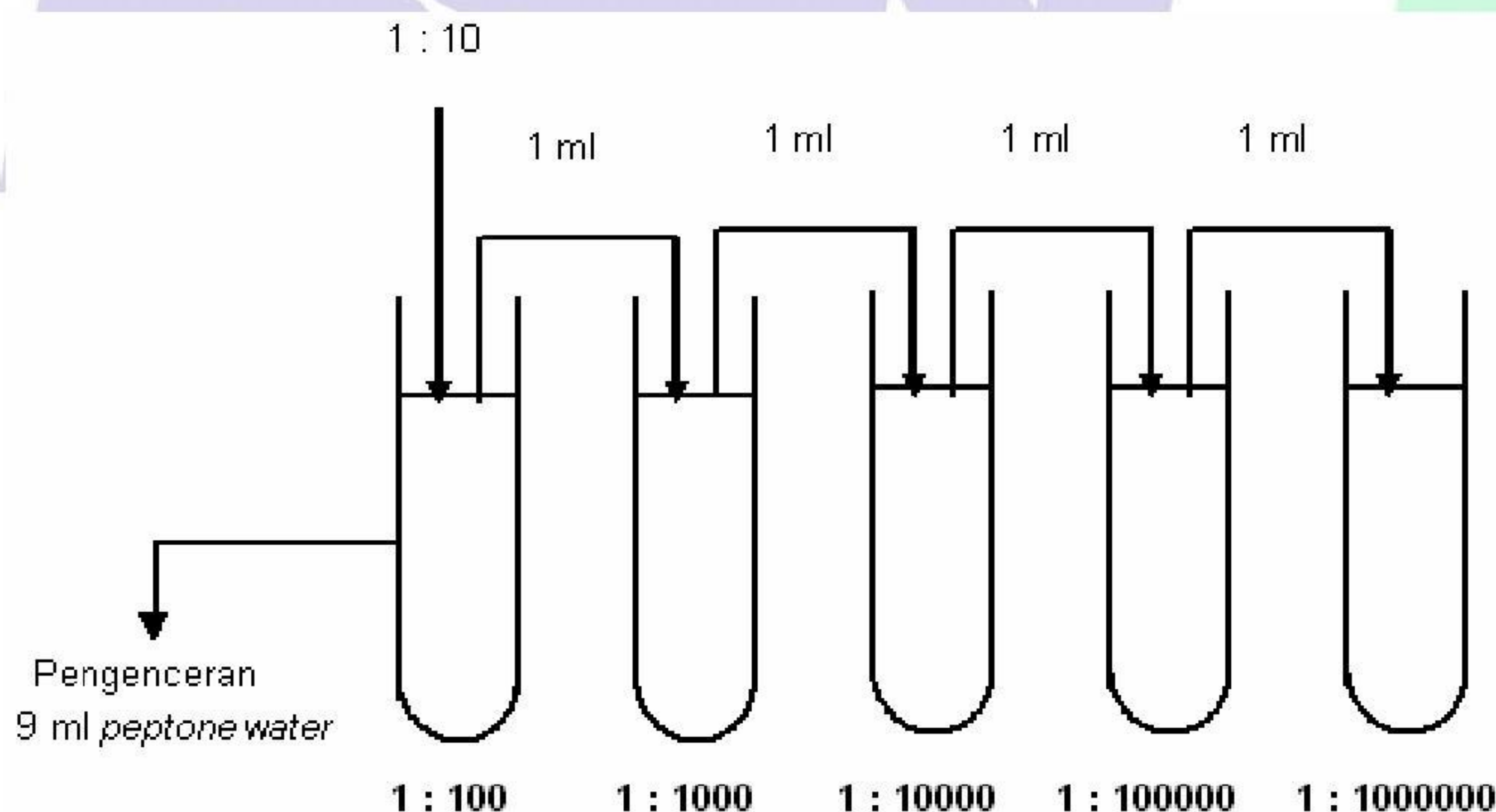
- | | |
|-----------------|-------|
| – Yeast extract | 2,5 g |
| – Tryptone | 5 g |
| – Glukosa | 1 g |

- Agar 15 g – 20 g
- Air suling 1 liter

Larutkan semua bahan-bahan, atur pH 7,0. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121°C selama 15 menit.

A.14.1.5 Cara kerja

- a. Timbang 10 g contoh, masukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 90 ml larutan pengencer hingga diperoleh pengenceran 1 : 10. Kocok campuran beberapa kali hingga homogen. Pengenceran dilakukan sampai tingkat pengenceran tertentu sesuai keperluan seperti pada Gambar A.3.
- b. Pipet masing-masing 1 ml dari pengenceran 10^1 – 10^5 ke dalam cawan petri steril secara duplo.
- c. Ke dalam setiap cawan petri tuangkan sebanyak 12 ml – 15 ml media PCA yang telah dicairkan yang bersuhu $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama.
- d. Goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan pembenihan.
- e. Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer dengan pembenihan untuk setiap contoh yang diperiksa.
- f. Biarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku.
- g. Masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering dan inkubasikan pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 48 jam.
- h. Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni – 250 koloni setelah 48 jam.
- i. Hitung angka lempeng total dalam 1 g contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan petri dengan faktor pengenceran yang digunakan.



Gambar A.3 - Metoda pengenceran

A.14.1.6 Pernyataan hasil

A.14.1.6.1 Cara menghitung

- (1) Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni – 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per g.
- (2) Jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 atau lebih

besar dari 250, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni – 250 koloni, dan hitung ALT dengan mempergunakan rumus:

$$ALT = \sum C / [(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]$$

dimana:

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri

n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung

n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua

d adalah pengenceran pertama yang dihitung

CONTOH:

| 10^{-2} | 10^{-3} |
|-----------|-----------|
| 120 | 25 |
| 105 | 20 |

$$ALT = 120 + 105 + 25 / [(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}] = 11904 \\ = 12000 (1,2 \times 10^4)$$

- (3) Jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 – 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran dan hitung ALT per g dengan rumus:

$$ALT = \sum C / [(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]$$

dengan:

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri

n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung

n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua

d adalah pengenceran pertama yang dihitung

CONTOH:

| 10^{-2} | 10^{-3} |
|-----------|-----------|
| 131 | 30 |
| 143 | 25 |

$$ALT = 131 + 143 + 30 + 25 / [(1 \times 2) + 0,1 \times 2) \times 10^{-2}] = 14954 \\ = 15000 (1,5 \times 10^4)$$

- (4) Bila jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan.
- a. Jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan: jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

CONTOH:

| 10^{-2} | 10^{-3} | Jumlah bakteri perkiraan |
|-----------|-----------|---|
| ~ | 640 | $1000 \times 640 = 640.000 (6,4 \times 10^5)$ |

- b. Jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, nyatakan hasilnya:
 area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2
 Contoh:

| 10^{-2} | 10^{-3} | area (cm^2) | jumlah bakteri perkiraan |
|-----------|-----------|------------------------|--|
| ~ | 7150 | 65 | $> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000$ ($6,5 \times 10^6$) |
| ~ | 6490 | 59 | $> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000$ ($5,9 \times 10^6$) |

- (5) Jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25 nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 dikalikan pengenceran yang terendah .
- (6) Menghitung koloni perambat, ada 3 macam perambat pada koloni, yaitu :
- Merupakan rantai yang tidak terpisah
 - Perambat yang terjadi di antara dasar cawan petri dan pembenihan
 - Perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.

Apabila terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Tetapi apabila ada satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.14.1.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri).

- Bila angka ketiga lebih besar dari 5, bulatkan ke atas.
 contohnya: 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya ($5,3 \times 10^2$)
- Bila angka ketiga kurang dari 5, bulatkan ke bawah.
 contohnya: 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya ($5,2 \times 10^2$)
- Bila angka ketiga 5, lakukan pembulatan sebagai berikut:
 - Bulatkan ke atas bila angka kedua merupakan angka ganjil.
 contohnya: 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya ($5,8 \times 10^2$)
 - Bulatkan ke bawah bila angka kedua merupakan angka genap
 contohnya: 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya ($5,6 \times 10^2$)

A.14.2 *E. coli*

A.14.2.1 Acuan

Bacteriological Analytical Manual, 2001, chapter 4

A.14.2.2 Prinsip

Dengan ditandai pembentukan gas pada tabung durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin) (Tabel A.5).

A.14.2.3 Peralatan

- Pinggian petri gelas (15 mm x 100 mm) atau plastik (15 mm x 90 mm), steril
- Pipet 1 ml dan 10 ml berskala
- Botol pengenceran (± 20 ml) gelas borosilikat yang resisten, dengan sumbat karet atau

- tutup uliran
- d. Lemari pengering (inkubator), $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$
- e. Tabung reaksi (16 mm x 150 mm) dan tabung Durham
- f. Rak untuk tabung reaksi
- g. Jarum inokulasi, dengan diameter dalam kira-kira 3 mm (ose)
- h. Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$

A.14.2.4 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- a. *Lauryl Sulfate Tryptose (LST) broth*
- b. *Brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2 %*
- c. *E. C. broth*
- d. *Levine's Eosin methylene blue (L-EMB) agar*
- e. *Plate Count Agar (PCA)*
- f. Pewarna gram
- g. *Tryptone broth*
- h. Pereaksi Kovacs
- i. MR - VP medium
- j. Pereaksi Voges Proskauer
- k. Larutan *Methyl Red*
- l. *Koser's Citrate Medium*
- m. *Peptone Water*
- n. Pereaksi Indole.
- o. Larutan Kalium hidroksida 40%
- p. *Butterfields phosfat buffered dilution water (BPBDW)*

A.14.2.5 Cara kerja

A.14.2.5.1 Presumptive test untuk bakteri koliform (uji dugaan)

- a. Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai butir 14.1.5 bagian a.
- b. Tiga tabung *lauryl sulfate tryptose (LST) broth* masing - masing diinokulasi dengan 1 ml dari setiap tingkat pengenceran (10^{-1} ; 10^{-2} dan 10^{-3}). Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik - 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya.
- c. Inkubasikan tabung-tabung tersebut selama 48 jam \pm 2 jam pada $35 ^\circ\text{C}$.
- d. Setelah 24 jam \pm 2 jam, periksa tabung-tabung yang telah mengandung gas. Ini adalah tabung-tabung yang positif.
- e. Tabung-tabung yang negatif diinkubasikan lagi selama 24 jam.
- f. Catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun, setelah inkubasi 48 jam \pm 2 jam, karena ini adalah *presumptive test* yang positif untuk bakteri koliform.
- g. Lakukan *confirmed test* terhadap semua tabung yang positif untuk *presumptive test*.

14.2.4.2 Confirmed test untuk *Escherichia coli*

- a. Tabung LST yang positif dikocok secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung.
- b. Pindahkan satu mata ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung *EC broth* yang berlainan.
- c. Inkubasikan tabung-tabung EC tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama 48 jam \pm 2 jam pada $45,5 ^\circ\text{C} \pm 0,2 ^\circ\text{C}$. Penangas air dipertahankan supaya tetap bersih, tertutup dan dengan tinggi permukaan air di atas permukaan tertinggi media dalam tabung.
- d. Terbentuknya gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi 48 jam \pm 2 jam dianggap positif.

- e. Tabung-tabung EC yang positif dikocok hati-hati lalu dari setiap tabung digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimum 0,5 cm.
- f. Inkubasikan pinggan agar L-EMB tersebut selama 18-24 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- g. Periksa pinggan - pinggan terhadap adanya koloni yang berwarna coklat dengan atau tanpa kilat logam.
- h. Dari tiap pinggan L-EMB, ambil dengan jarum, paling sedikit 2 koloni yang mencurigakan yang letaknya terpisah dan pindahkan pada tabung agar miring PCA untuk digunakan sebagai inokulum pada uji biokimia.
- i. Tabung-tabung agar miring dari koloni yang dicurigai ini diinkubasikan selama 18 jam - 24 jam pada suhu 35°C . Buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan, *E. coli* adalah Gram negatif dan berbentuk batang tak berspora.
- j. Uji sifat - sifat biokimia dengan menggunakan reaksi-reaksi IMVIC.
 - 1) Pembentukan indol
 - Inokulasi tabung *tryptone broth*.
 - Inkubasi selama 24 jam \pm 2 jam pada suhu $(35 \pm 1)^{\circ}\text{C}$.
 - Uji adanya indol dengan menambahkan 0,2 ml - 0,3 ml pereaksi Kovacs.
 - Uji ini positif bila lapisan atas berwarna merah.
 - 2) Reaksi Voges Proskauer dan *Methyl Red*
 - Inokulasi tabung medium MR - VP dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu $(35 \pm 1)^{\circ}\text{C}$.
 - Secara aseptis pindahkan 1 ml biakan tabung reaksi steril.
 - Tambahkan 0,6 ml larutan 5 % alfa naftol dalam alkohol, 0,2 ml larutan KOH 40% dan beberapa butir kristal kreatin.
 - Uji Voges Proskauer adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
 - Tabung medium MR - VP yang semula, diinkubasikan kembali selama 48 jam pada $(35 \pm 1)^{\circ}\text{C}$.
 - Tambahkan 5 tetes indikator methyl red pada setiap tabung.
 - Biakan dianggap MR positif bila terjadi warna merah, MR negatif bila kuning.
 - 3) Penggunaan Sitrat
 - Dengan hati - hati tabung *Koser's citrate medium* diinokulasi dengan menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan medium. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat - zat lain.
 - Inkubasikan selama 96 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
 - Adanya pertumbuhan dalam tabung menandakan uji yang positif (perubahan warna dari hijau ke biru).
 - 4) Pembentukan gas dari *Lactose*
 - Inokulasikan tabung *LST broth* dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama 48 jam pada suhu 35°C . Periksa tabung-tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

14.2.5 Klasifikasi dan laporan

- Reaksi biokimia *E. coli* pada uji IMVIC

Tabel A.4 - Reaksi biokimia *E. coli* pada uji IMVIC

| Jasad | Indol | Methyl red | Voges Proskauer | Citrate |
|-------------------------|-------|------------|-----------------|---------|
| <i>Escherichia Coli</i> | | | | |
| Varitas I | + | + | - | - |
| Varitas II | - | + | - | - |

- Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila IMVIC adalah + + - - atau - + - -, pewarnaan Gram

menunjukkan Gram negatif bentuk batang tidak berspora atau *coccus* yang membentuk gas dalam LST *broth* pada waktu inkubasi 48 jam \pm 2 jam.

- Hitunglah APM *E. coli* dengan menggunakan Tabel APM (Tabel A.5) berdasarkan jumlah tabung-tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *E. coli*.

Tabel A.5 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran (0,10 g/ml, 0,01 g/ml dan 0,001 g/ml contoh)

| Tabung yang positif | | | APM | Tabung yang positif | | | APM |
|---------------------|------|-------|-----|---------------------|------|-------|-------|
| 0,10 | 0,01 | 0,001 | | 0,10 | 0,01 | 0,001 | |
| 0 | 0 | 0 | < 3 | 2 | 2 | 0 | 21 |
| 0 | 0 | 1 | 3 | 2 | 2 | 1 | 28 |
| 0 | 1 | 0 | 3 | 2 | 2 | 2 | 35 |
| 0 | 1 | 1 | 6 | 2 | 3 | 0 | 29 |
| 0 | 2 | 0 | 6 | 2 | 3 | 1 | 36 |
| 0 | 3 | 0 | 9 | 3 | 0 | 0 | 23 |
| 1 | 0 | 0 | 4 | 3 | 0 | 1 | 38 |
| 1 | 0 | 1 | 7 | 3 | 0 | 2 | 64 |
| 1 | 0 | 2 | 11 | 3 | 1 | 0 | 43 |
| 1 | 1 | 0 | 7 | 3 | 1 | 1 | 75 |
| 1 | 1 | 1 | 11 | 3 | 1 | 2 | 120 |
| 1 | 2 | 0 | 11 | 3 | 1 | 3 | 160 |
| 1 | 2 | 1 | 15 | 3 | 2 | 0 | 93 |
| 1 | 3 | 0 | 16 | 3 | 2 | 1 | 150 |
| 2 | 0 | 0 | 10 | 3 | 2 | 2 | 210 |
| 2 | 0 | 1 | 14 | 3 | 2 | 3 | 290 |
| 2 | 0 | 2 | 20 | 3 | 3 | 0 | 240 |
| 2 | 1 | 0 | 15 | 3 | 3 | 1 | 460 |
| 2 | 1 | 1 | 20 | 3 | 3 | 2 | 1100 |
| 2 | 1 | 2 | 27 | 3 | 3 | 3 | >1100 |

A.14.3 Kapang

A.14.3.1 Acuan

Bacteriological Analytical Manual, 2001, chapter 18.

A.14.3.2 Prinsip

Pertumbuhan kapang dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu 25 °C \pm 1 °C selama 5 hari.

A.14.3.3 Pembenihan dan pengencer

- Larutan pengencer *Butterfield's phosphate-buffered*
- PCA (*Plate Count Agar*) yang telah ditambah 100 mg/l kloramfenicol atau Agar DG18 (*Dichloran 18 % gliserol*) atau agar DRBC (*Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol*). Penambahan larutan kloramfenikol ke dalam PCA dilakukan dengan melarutkan 0,1 g kloramfenikol dalam 40 ml air destilata sebagai larutan stok, lalu ditambahkan ke dalam 960 ml medium yang akan diotoklaf. Jika bahan diduga mengandung banyak bakteri, maka ke dalam medium yang telah steril ditambahkan klortetrasiklin yang disterilisasi dengan membran filter sehingga konsentrasi dalam media 50 mg/ml. Jika kedua antibiotik itu dipakai, maka ke dalam 970 ml media yang akan disterilisasi ditambahkan

20 ml larutan stok kloramfenikol. Larutan stok tetrasiklin dibuat dengan melarutkan 0,5 g tetrasiklin dalam 100 ml air destilata, lalu disterilisasi dengan filter. Sebanyak 10 ml larutan stok tetrasiklin ditambahkan ke dalam 970 ml media steril yang telah mengandung kloramfenikol.

– **Agar DG18**

| | |
|---|--------|
| Glukosa | 10,0 g |
| Pepton | 5,0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1,0 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,5 g |
| Larutan 0.2 % Dichloran (2,6-dichloro-4-nitroanilin) dalam etanol | 1,0 ml |
| Kloramfenikol | 0,1 g |
| Agar | 15,0 g |
| Air destilata | 800 ml |

Larutkan semua bahan dan tepatkan volumenya sampai 1000 ml. Tambahkan 220 g gliserol dan sterilisasi dengan otoklaf pada 121 °C selama 15 menit. Dinginkan medium sampai suhu 45 °C sebelum dipakai.

– **Agar DRBC**

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Glukosa | 10,0 g |
| <i>Bacteriological peptone</i> | 5,0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1,0 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,5 g |
| Larutan 5% Rose bengal | 0,5 ml |
| Larutan 0.2% dikloran dalam etanol | 1,0 ml |
| Kloramfenikol | 0,1 g |
| Agar | 15,0 g |
| Air destilata | 1000 ml |

pH akhir harus 5,6
Campurkan bahan, panaskan untuk melarutkan dan disterilisasi dengan otoklaf pada 121 °C selama 15 menit. Dinginkan medium sampai suhu 45 °C sebelum dipakai.

A.14.3.4 Peralatan

- Cawan petri (100 mm x 15 mm)
- Pipet ukur 1 ml dan 10 ml
- Penangas air (45 ± 1) °C
- Lemari pengeringan 25 °C atau suhu kamar
- Alat penghitung koloni
- Mikroskop

A.14.3.5 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai butir 14.1.5.a.
- Pipet 1 ml dari masing-masing pengenceran 10¹ – 10² ke dalam cawan petri steril secara duplo. Tuangkan medium yang telah dicairkan (suhu 45 ± 1)°C sebanyak 20 ml - 25 ml ke dalam cawan petri dan goyangkan cawan petri sedemikian rupa sehingga campuran tersebar merata.
- Setelah pembedihan membeku, inkubasikan pada suhu (25 ± 1)°C selama 5 hari (tanpa dibalik).
- Hitung koloni kapang (dapat dilakukan mulai hari ketiga sampai kelima). Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu inkubasi selama 48 jam
- Laporkan atau catat hasil sebagai jumlah kapang per g contoh.

A.14.3.6 Pernyataan hasil

Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10 koloni – 150 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah kapang per g.

Keterangan:

- (1) Koloni kapang biasanya buram dan berbulu.
- (2) Koloni khamir berwarna putih dan licin (berbau asam).
- (3) Tegaskan koloni dengan pemeriksaan di bawah mikroskop sehingga yakin bahwa koloni tersebut adalah kapang.



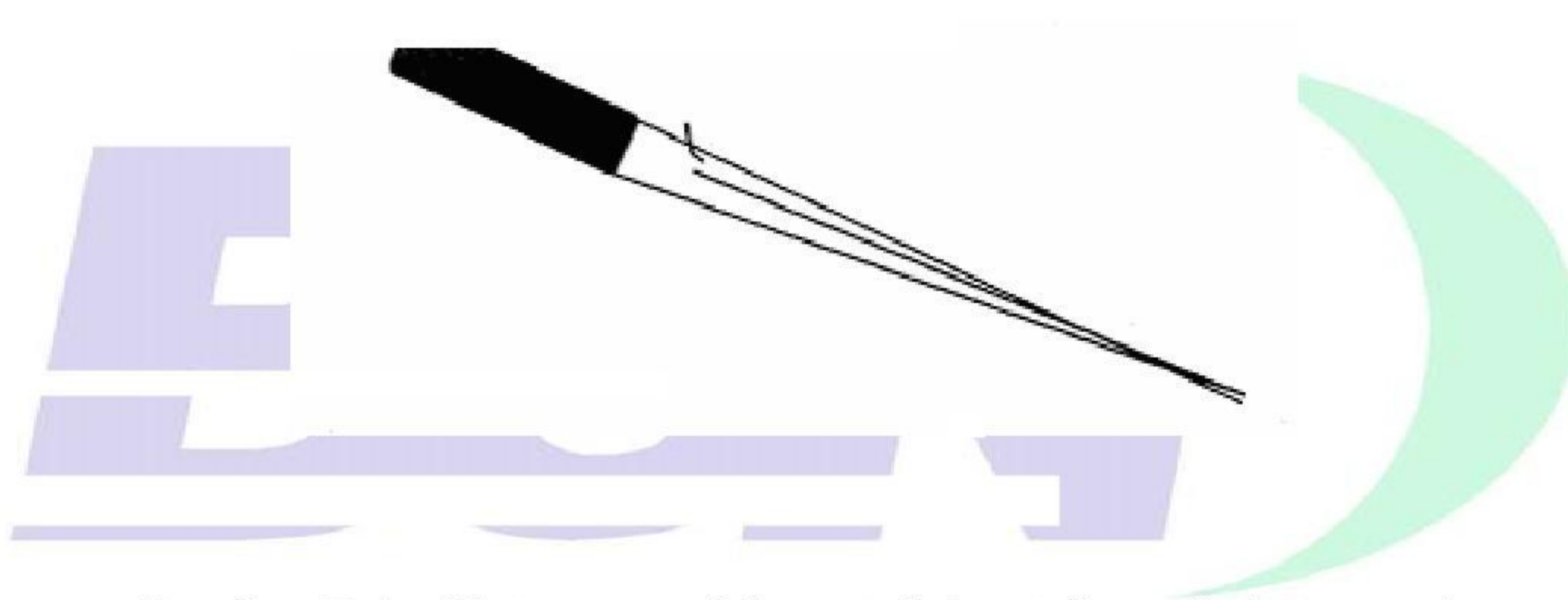
Lampiran B
(informatif)
Pengambilan contoh

B.1 Acuan

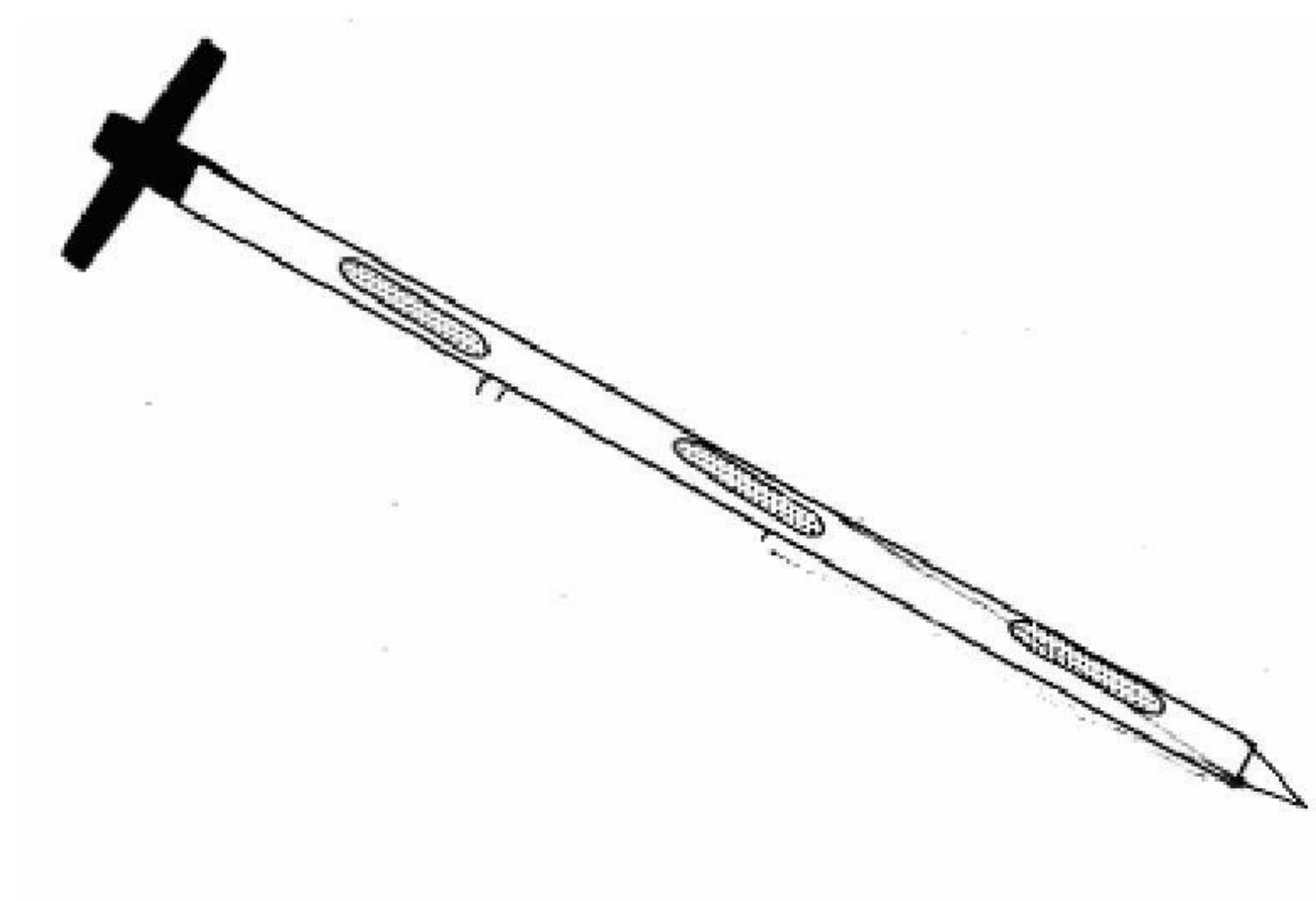
AOAC Official Method, 2000 925.08. *Sampling of Flour*

B.2 Peralatan

- a) Alat pengambilan contoh dapat berbentuk tombak maupun sekop berdiameter $\frac{1}{2}$ " (13 mm), slit $\geq \frac{1}{3}$ lingkaran (lihat Gambar 1 dan Gambar 2)
- b) Kayu pembagi
- c) Kantong pengemas/plastik yang terbuat dari bahan yang tidak mempengaruhi sifat kimia contoh
- d) *Sealer* /penutup



Gambar B.1 - Alat pengambil contoh bentuk tombak tunggal



Gambar B.2 - Alat pengambil contoh bentuk sekop ganda

B.3 Cara kerja

B.3.1 Pengambilan contoh

Pengambilan contoh menggunakan alat yang bersih dan kering, dilaksanakan di tempat yang terlindung dari hal-hal yang dapat mempengaruhi contoh.

Pengambilan contoh dalam karung

Cara pengambilan contoh dilakukan secara acak sesuai dengan Tabel B.1.

Tabel B.1 - Jumlah contoh yang harus diambil

| Jumlah contoh per lot (karung) | Jumlah contoh yang harus diambil (karung) |
|-----------------------------------|--|
| s/d 10 | Semua contoh |
| 11 – 25 | 5 |
| 26 – 50 | 7 |
| 51 – 100 | 10 |
| > 100 | Akar pangkat dua dari jumlah contoh |

Apabila jumlah tanding lebih dari 1000 karung, maka harus dibuat tanding baru sesuai dengan jumlah masing-masing bagian diakar pangkat dua.

Dari setiap karung yang disampel, ambil contoh dengan cara menusukkan alat skop pada sudut bagian atas, tengah dan bawah secara diagonal atau vertikal, kemudian diaduk dan dilakukan kuartering sampai mencapai sejumlah contoh yang diperlukan untuk analisis.

B.3.2 Penanganan contoh

Contoh dikemas sedemikian rupa sehingga terlindung selama pengangkutan serta diberi label yang mencantumkan tanggal pengambilan contoh dan keterangan lain. Berat masing-masing contoh minimal 1 kg.

Untuk uji mikrobiologi, pengambilan contoh dilakukan secara aseptik.

B.4 Persiapan contoh

Sebelum contoh dianalisis, contoh diaduk hingga homogen dengan cara membolak-balikkan lebih dari 25 kali. Hindarkan contoh dari cahaya matahari dan kelembaban dan selalu disimpan dalam keadaan tertutup rapat untuk menghindari kerusakan contoh.

Bibliografi

AOAC Official Method, 2000 999.11, *Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron and Zinc in Foods. AAS Method after Dry Ashing.*

Codex Alimentarius Commission 1994, Codex stan 1521985 (amended 1991, *codex standard for wheat flour* in Codex Alimentarius Volume V11: *Codex standards for cereals, pulses, legumes, derived products, Food and Agricultural Organization of the United Nations, World Health Organization, Second edition, Rome.*

US FDA, 2001, *Bacteriological Analytical Manual.*

Peraturan Menteri Kesehatan RI No 722/Men.Kes/PER/IX/88 tentang Bahan Tambahan Pangan.

SNI 01-6057-1999, Tepung garut.

SNI 01-3751-2006, Tepung terigu sebagai bahan makanan.

AOAC Official Method, 2000 925.10, *Solid (Total) and Moisture in Flour.*

AOAC Official Method, 2000 923.03, *Ash of Flour. Direct Method*

AOAC Official Method, 2000 941.16, *Filth in Grain Products and Brewer's Grits.*

SNI 01-2891-1992, *Cara uji makanan dan minuman.*

SNI 01-2894-1992, *Cara uji bahan pengawet makanan dan bahan tambahan yang dilarang untuk makanan.*

SNI 01-3555-1998, *Cara uji minyak dan lemak.*

SNI 01-4866-1998, *Cara uji cemaran arsen dalam makanan.*

SNI 19-2896-1998, *Cara uji Cemaran logam dalam makanan.*





BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id